

BLOOD GROUPING METHOD

Publication number: JP2001056341 (A)

Publication date: 2001-02-27

Inventor(s): SUZUOKI JUN; MATSUDA SHINJIRO +

Applicant(s): WAKO PURE CHEM IND LTD +

Classification:

- **international:** *G01N33/53; G01N33/543; G01N33/80; G01N33/53; G01N33/543; G01N33/80; (IPC1-7): G01N33/53; G01N33/543; G01N33/80*

- **European:**

Application number: JP19990233765 19990820

Priority number(s): JP19990233765 19990820

Abstract of **JP 2001056341 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To determine the blood type of a sample in a short time by dripping a liquid sample containing erythrocytes from above into contact with a substance which is fixed to an upper surface of a porous body, into which erythrocytes are permeable by capillarity, and is specifically united with a blood type substance to determine the presence or absence of a union between the specifically uniting substance and erythrocytes. **SOLUTION:** A porous sheet-shaped or membrane object, foam, woven object, or the like is, for example, used for a porous body into which erythrocytes are permeable by capillarity, and an antibody, lectin, or the like is, for example, used for a substance to be specifically binded with a blood-type substance. A liquid sample containing erythrocytes is dripped from above into contact with the blood-type specific uniting substance fixed on the upper surface of the porous body. Then an isotonic solution such as a physiological salt solution, phosphate buffer physiological salt solution is dripped to clean the porous body to avoid error recognition between coloring derived from the erythrocytes binded with the blood-type determining part of the porous body and coloring derived from other residual erythrocytes. After this, the blood type of the sample is determined by the presence or absence of a binding between the specifically binding substance and erythrocytes.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-56341

(P2001-56341A)

(43) 公開日 平成13年2月27日 (2001.2.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/80		C 0 1 N 33/80	2 G 0 4 j
33/53		33/53	K
33/543	5 2 1	33/543	5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平11-233765	(71) 出願人	000252300 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22) 出願日	平成11年8月20日 (1999.8.20)	(72) 発明者	鈴置 純 兵庫県尼崎市高旧町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		(72) 発明者	松田 真次郎 兵庫県尼崎市高旧町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内
		F ターム (参考)	2G045 AA09 BB21 BB22 BB48 BB51 CA02 FA18 FB03 FB15 GC12

(54) 【発明の名称】 血液型判定方法

(57) 【要約】

【課題】 操作が簡便で且つ血液型の判定を迅速に行える血液型判定方法、及びこれに用いる血液型判定用試験用具、並びに試薬キットを提供することを目的とする。

【解決手段】 赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体の上面に固定化された、血液型物質に特異的に結合する物質に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該特異的結合物と当該赤血球との結合の有無により当該試料の血液型を判定する方法、及びこれに用いる血液型判定用試験用具並びに試薬キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体の上面に固定化された、血液型物質に特異的に結合する物質に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該特異的結合物質と当該赤血球との結合の有無により当該試料の血液型を判定する方法。

【請求項2】 血液型物質に特異的に結合する物質が、抗A型抗体、抗B型抗体及び抗D型抗体からなる群より選ばれた少なくとも1種以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 血液型物質に特異的に結合する物質が、抗C型抗体、抗c型抗体、抗E型抗体、抗e型抗体及び抗D型抗体からなる群より選ばれた少なくとも1種以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 多孔体が、3～100 μ mの孔径を有するものである、請求項1～3の何れかに記載の方法。

【請求項5】 血液型物質に特異的に結合する物質が上面に固定化された、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体からなる血液型判定用試験用具。

【請求項6】 その下面に吸収体が接触している多孔体からなる、請求項5に記載の試験用具。

【請求項7】 血液型物質に特異的に結合する物質が、抗A型抗体、抗B型抗体及び抗D型抗体からなる群より選ばれた少なくとも1種以上である、請求項5及び6に記載の試験用具。

【請求項8】 血液型物質に特異的に結合する物質が、抗C型抗体、抗c型抗体、抗E型抗体、抗e型抗体及び抗D型抗体からなる群より選ばれた少なくとも1種以上である、請求項5及び6に記載の試験用具。

【請求項9】 多孔体が、3～100 μ mの孔径を有するものである、請求項5～8の何れかに記載の試験用具。

【請求項10】 血液型物質に特異的に結合する物質が上面に固定化された、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体からなることを特徴とする、血液型判定用試薬キット。

【請求項11】 その多孔体の下面に接触している吸収体とからなることを特徴とする、請求項10に記載のキット。

【請求項12】 血液型物質に特異的に結合する物質が、抗A型抗体、抗B型抗体及び抗D型抗体からなる群より選ばれた少なくとも1種以上である、請求項10及び11に記載のキット。

【請求項13】 血液型物質に特異的に結合する物質が、抗C型抗体、抗c型抗体、抗E型抗体、抗e型抗体及び抗D型抗体からなる群より選ばれた少なくとも1種以上である、請求項10及び11に記載のキット。

【請求項14】 多孔体が、3～100 μ mの孔径を有するものである、請求項10～13の何れかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、赤血球表面に存在する血液型物質に基づいた血液型判定方法、及びこれに用いる血液型判定用試験用具並びに試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】血液型には、ABO式血液型、Rh式血液型、HLA血液型等多くの種類の存在する。なかでも、ABO式血液型の判定は、輸血時の供血者と受血者の適合性（輸血副作用）等の問題から特に重要であり、一般に広く行われている。

【0003】ABO式血液型は、赤血球の表面に存在する血液型物質であるA抗原、B抗原の有無による分類で、A型のヒトはその赤血球表面にA抗原、その血清中に抗B抗体を、またB型のヒトはその赤血球表面にB抗原、その血清中に抗A抗体を夫々保有している。

【0004】従って、ABO式血液型の判定は、赤血球表面の血液型物質（血液型抗原）を検査する表試験の結果と、血清中の抗A抗体、抗B抗体を検査する裏試験の結果を照合して行われる。

【0005】また、Rh式血液型の不適合が輸血副作用や新生児溶血症疾患等の原因となることから、臨床上重要な血液型として知られており、Rh式血液型の判定も、一般に広く行われている。

【0006】Rh式血液型は、アカゲザルの血液をウサギに注射して得られた抗血清がヒトの赤血球を凝集することを発見し、このようなヒトをRh陽性、また赤血球が凝集しないヒトをRh陰性と分類した。その後、ヒト由来の抗体の検出によりRh式血液型が確立し、現在では40種類以上のRh抗体が発見されている。

【0007】これらのABO式血液型の表試験やRh式血液型の判定には、2～5%生食液浮遊血球（試料）と血液型判定用抗体（血液型物質への特異的抗体）溶液とを試験管内で混合した後、遠心分離処理（3000rpm、15秒）し、血球沈澱をほぐしながら凝集の有無を観察する試験管法や、5～10%生食液浮遊血球（試料）と血液型判定用抗体溶液とをスライドグラス上で混合して凝集の有無を観察するスライドグラス法等が知られているが、これらの方法は、凝集の有無による判定であるため、熟練が必要であり、判定精度が低いという問題点や、ABO式血液型の場合、抗A抗体、抗B抗体の2種類、Rh式血液型の場合、抗C抗体、抗c抗体、抗D抗体、抗E抗体、抗e抗体の5種類の判定用抗体溶液を用いて凝集の有無を夫々観察する必要があり、操作が煩雑であるという問題点等があった。

【0008】これらの方法の問題点を解決するために、所謂イムノクロマト法と呼ばれる方法に基づくラテラルフロー型の試験用具を用いる判定方法が開発されている。この方法は、例えば抗A抗体（A型判定部）及び／又は抗B抗体（B型判定部）を固定化したニトロセルロ

ース膜等でできた多孔体(展開膜)をポリ塩化ビニルシート等の支持体上に貼り付けた試験用具の先端(液体試料滴下部)に、赤血球を含む液体試料を滴下し、当該赤血球を毛管現象により判定部へ水平に移動させ、判定部での結合の有無を調べることに、当該試料の血液型を判定するというものである。しかしながら、当該試料中の赤血球が展開膜を展開して判定部に移動するまでに約10分程度を要するため、迅速な判定ができないという問題点があり、更なる改良が望まれていた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、操作が簡便であり、且つ例えば1分以内という極めて短時間で判定可能な血液型判定方法、及びこれに用いる血液型判定用試験用具並びに試薬キットを提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体の上面に固定化された、血液型物質に特異的に結合する物質に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該特異的結合物質と当該赤血球との結合の有無により当該試料の血液型を判定する方法の発明である。

【0011】また、本発明は、血液型物質に特異的に結合する物質が上面に固定化された、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体からなる血液型判定用試験用具の発明である。

【0012】更に、本発明は、血液型物質に特異的に結合する物質が上面に固定化された、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体からなることを特徴とする、血液型判定用試薬キットの発明である。

【0013】即ち、発明者等は、操作が簡便であり且つ迅速に判定可能な血液型物質に基づいた血液型判定方法を開発すべく鋭意研究を行った結果、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体の上面に固定化された、血液型物質に特異的に結合する物質に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該特異的結合物質と当該赤血球との結合の有無により当該試料の血液型判定を行えば、従来の血液型判定方法に於ける上記した如き問題を解決して、簡便な操作により、血液型を極めて短時間で判定し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】本発明に於いて用いられる、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体(以下、本発明に係る多孔体と略記する。)としては、毛管現象が生じ得る性質を有するものであり、且つ赤血球を含む液体試料を接触させた場合に、その毛管現象により赤血球が浸透可能であるようなものであれば何れでもよく、例えば多孔性のシート状乃至膜状物、フォーム(発泡体)、織布状物、不織布状物、編物状物等が挙げられる。また、その孔径としては、例えば、通常3~100 μ m、好ましくは5~80 μ m、より好ましくは8~50 μ mである。これらの素材としては、天然、半合成又は合成の繊維状等が挙げられ、これら素材を、抄紙、製膜、発泡成型、編製、織製等の常法により成型することにより得ることができる。これら素材の具体例としては、例えば綿、麻、絹、セルロース、ロックウール、獣毛、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ガラス繊維、カーボン繊維、ボロン繊維、ポリアミド、アラミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、レーヨン、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン等が挙げられる。尚、これら多孔体に更にアミノ基、カルボキシル基等の官能基を導入した、所謂活性基修飾多孔体も本発明の多孔体に包含される。また、該多孔体の形状は、特に限定されないが、矩形乃至方形や円形乃至楕円形が一般的である。

【0015】本発明に於いて用いられる血液型物質に特異的に結合する物質(以下、血液型特異的結合物質と略記する。)としては、血液型物質(血液型抗原)に特異的に結合する物質なら何れでもよく、例えば抗体、レクチン等が挙げられる。

【0016】当該抗体としては、例えば抗A抗体、抗B抗体等のABO式血液型抗原に対する抗体、例えば抗D抗体、抗C抗体、抗c抗体、抗E抗体、抗e抗体等のRh式血液型抗原に対する抗体、例えば抗M抗体、抗N抗体、抗S抗体、抗s抗体等のMNSs血液型抗原に対する抗体、例えば抗Pⁱ抗体、抗P^k抗体、抗P¹P^k抗体等のP式血液型抗原に対する抗体、例えば抗Le^a抗体、抗Le^b抗体等のLewis式血液型抗原に対する抗体、例えば抗K抗体、抗k抗体等のKell式血液型抗原に対する抗体、例えば抗Fy^a抗体、抗Fy^b抗体等のDuffy式血液型抗原に対する抗体、例えば抗Jk^a抗体、抗Jk^b抗体等のKidd式血液型抗原に対する抗体、例えば抗Di^a抗体、抗Di^b抗体等のDiego式血液型抗原に対する抗体等が挙げられる。

【0017】該抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、均一な性質を有する抗体の得易さ等を考慮すると、ポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体の方が好ましい。

【0018】これらの抗体は、市販品を用いてもよいし、例えば、兎、馬、羊、山羊、ラット、マウス等の動物抗血清から公知の方法〔例えば、「免疫実験学入門、第2刷、松橋直等、(株)学会出版センター(1981)」に記載の方法、「タンパク質精製法、Robert.K.Scopes著、シュプリンガー・フェアラーク東京(株)、1985年、37頁~179頁」に記載された方法等〕で取得されるポリクローナル抗体、或いは細胞融合技術や遺伝子組み換え技術等を利用した公知の方法〔Nature, vol. 256, 498(1975)に記載の方法、Eur. J. Immunol, 6, 511(1976)に記載の方法等〕で取得されるモノクローナル

抗体を用いてもよい。尚、これらを単独で用いても適宜組み合わせ用いてもよい。

【0019】また、本発明に於いて用いられる血液型特異的結合物質としての抗体には、上記の抗体の一部、例えば、当該抗体をパパイン等で部分分解して得られるF(ab')₂フラグメント、F(ab')₂フラグメントを還元して得られるFab'フラグメント等の、所謂抗体フラグメントも包含される。

【0020】また、上記のレクチンとしては、例えば抗A1レクチン(ヒマヤフジマメ由来)、抗Hレクチン(ハリエニシダ由来)等が挙げられる。

【0021】これらレクチンは、市販品を用いてもよいし、例えば公知の方法〔例えば、「日本臨床衛生検査技師会ライブラリー XII 輸血検査の実際、改訂第1版、「日本臨床輸血検査標準法」改訂委員会著、(社)日本臨床衛生検査技師会、1996年、171頁」に記載の方法等。〕で取得されるものを用いてもよい。

【0022】本発明に於いて、血液型特異的結合物質を本発明に係る多孔体に固定化させる方法としては、通常この分野で用いられる方法であれば何れでもよく、例えば上記の本発明に係る多孔体に上記した如き血液型特異的結合物質を含有する溶液を、例えば塗布、滴下或いは噴霧等した後、これを乾燥して物理的吸着により固定化させる方法、本発明に係る多孔体中の例えばアミノ基、カルボキシル基等の官能基を利用して化学的に血液型特異的結合物質を固定化させる方法、目的の免疫反応に関与しないタンパク質を血液型特異的結合物質と結合させた後、例えば塗布、滴下或いは噴霧等した後、これを乾燥して物理的吸着により固定化させる方法等が挙げられる。

【0023】このようにして得られた血液型特異的結合物質が固定化された本発明に係る多孔体は、非特異的な吸着による測定への影響を防止するために、所謂ブロッキング処理を施しておくことが望ましい。このようなブロッキング処理は、通常この分野で行われる方法、例えば上記の多孔体を例えばアルブミン、グロブリン、カゼイン、ポリビニルアルコール、界面活性剤等のブロッキング剤(但し、測定への影響のないものを選択して使用する。)を含有する適当な緩衝液(例えば、pHが5~9程度で、10~500mMの例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナル緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等)中に適当な時間浸漬した後乾燥する方法等により行えばよい。

【0024】血液型特異的結合物質の本発明に係る多孔体への固定量は、測定対象物質(即ち、血液型物質)の種類や、検出限界等をどの程度に設定するかによって変動するが、例えば本発明に係る多孔体の血液型特異的結合物質が固定化される部分の単位面積(cm²)当たりの固定量として、通常0.01μg~1mg、好ましくは0.1μg~100μg、より好ましくは1μg~10μgである。

【0025】本発明の判定方法は、例えば以下の如く行えばよい。

【0026】赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体の上面に固定化された血液型特異的結合物質に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、要すれば、該多孔体の血液型判定部に結合した赤血球に由来する着色と、多孔体上面に残存しているその他の赤血球に由来する着色との誤認を避けるため、例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)等の等張液を更に上方から滴下して当該多孔体を洗浄し、その結果生じる当該特異的結合物質と当該赤血球との結合の有無により当該試料の血液型の判定を行う。尚、余分な赤血球を含む液体試料等を当該多孔体から効率よく除去し、多孔体に残存しているだけの赤血球に由来する着色による誤認を避けるために、当該多孔体の下面に吸収体を密着させて余分な当該試料を吸収させるか、或いは当該多孔体を、例えば目皿付きロート、ガラスフィルター等の吸収処理を行える器具上に置いて、適当な時期に余分な液体試料を下面から吸引除去することが望ましい。当該多孔体が液体試料を充分吸収するだけの厚みを有していない場合は、特にこのような対策が望まれる。

【0027】即ち、このような操作を行うと当該赤血球が当該血液型特異的結合物質と結合する場合には、当該箇所に赤血球が集積される結果、この赤血球の赤色(以下、「赤血球の結合に由来する着色」という場合もある。)を認識することができるようになるので、このような現象の有無を確認することで血液型の判定が可能となる。尚、判定までに要する時間は15~30秒程度、長くても1分以内である。

【0028】判定は、目視で行っても、また、例えばプレテスター RM-405、プレテスターRM-505〔何れも和光純薬工業(株)製〕等の尿試験紙用のテスター、例えばデンストメーター等の機器を用いて行ってもよい。

【0029】図1に判定原理を示す。

【0030】本発明に係る多孔体の下面に吸収体を密着させる場合、これらは、相互間に毛管現象が生じるように接着されていけばよい。

【0031】このような目的で使用される吸収体としては、余分な液体試料を効率よく吸収することのできるものなら何れでもよく、例えば多孔性のシート状乃至膜状物、フォーム(発泡体)、織布状物、不織布状物、編物状物等が挙げられる。また、その孔径としては、通常8μm以上であればよい。これらの素材としては、天然、半合成又は合成の繊維状等が挙げられ、これら素材を、抄紙、製膜、発泡成型、編製、織製等の常法により成型することにより得ることができる。これら素材の具体例としては、例えば綿、麻、絹、セルロース、ロックウール、獣毛、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ガラス繊維、カーボン繊維、ボロン繊維、ポリアミド、アラミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテ-

ト、レーヨン、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン等が挙げられる。また、当該吸収体への吸水量を増加させるために、紙おむつ等の吸水性樹脂を内包したものでもよい。さらに、該多孔体の形状は、特に限定されないが、矩形乃至方形や円形乃至楕円形が一般的である。

【0032】本発明の判定方法に於いて、種類の異なる血液型特異的結合物質が複数種固定された多孔体を用いてこれを行えば、血液型の判定を一回の操作で行うことができる。本発明に係る多孔体に、種類の異なる血液型特異的結合物質を複数種固定化させるに当たっては、通常、当該多孔体の異った特定の領域に夫々別々に適当な形状（直線状、円形状、方形等）で固定化すればよいが、なかでも直線状に平行して固定化させるのが好ましい。

【0033】例えば、血液型特異的結合物質として抗A抗体及び抗B抗体を用いて本発明の判定方法を行えば、ABO式血液型の判定、即ち、A型、B型、AB型又はO型の判定を一回の操作で行うことができる。

【0034】即ち、図2に示すように、本発明に係る多孔体に固定化された抗A抗体と抗B抗体に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該抗A抗体と抗B抗体の固定部位（判定部）に於ける赤血球の結合に由来する着色をもとに当該試料の血液型の判定を行えばよい。尚、図2で用いた液体試料はA型赤血球を含有するものである。

【0035】そして、上記ABO式血液型の判定に於いて、抗A抗体固定部位（A型判定部）にのみ赤血球に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはA型の抗原のみが存在していることから、血液型はA型と判定され、抗B抗体固定部位（B型判定部）にのみ赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはB型の抗原のみが存在していることから、血液型はB型と判定される。また、抗A抗体固定部位（A型判定部）及び抗B抗体固定部位（B型判定部）の両方に赤血球に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはA型とB型の両方の抗原が存在していることから、血液型はAB型と判定され、抗A抗体固定部位（A型判定部）及び抗B抗体固定部位（B型判定部）の何れにも赤血球の結合に由来する着色が認められない場合、試料中の赤血球にはA型とB型の両方の抗原が存在していないことから、血液型はO型と判定される。

【0036】また、例えば抗A抗体、抗B抗体、抗D抗体を用いて本発明の判定方法を行えば、ABO式血液型の判定のみならずRh式血液型のうち最も重要であるD型の判定、即ち、A型、B型、AB型又はO型の判定とD型陽性又はD型陰性の判定とを一回の操作で同時に行うことができる。

【0037】即ち、図3に示すように、本発明に係る多

孔体に固定化された抗A抗体、抗B抗体及び抗D抗体に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該抗A抗体、抗B抗体、抗D抗体の固定部位（判定部）に於ける赤血球の結合に由来する着色をもとに当該試料の血液型の判定を行えばよい。尚、図3で用いた液体試料はABO式血液型がA型であって、D型陽性である赤血球を含有するものである。

【0038】そして、上記ABO式血液型とD型の同時判定に於いて、ABO式血液型の判定は先に述べたとおりである。また、D型の判定は、抗D抗体固定部位（D型判定部）に赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはD型の抗原が存在していることから、D型陽性と判定され、抗D抗体固定部位に赤血球の結合に由来する着色が認められない場合、試料中の赤血球にはD型の抗原が存在していないことから、D型陰性と判定される。

【0039】更に、例えば抗D抗体、抗C抗体、抗E抗体、抗c抗体及び抗e抗体を用いて本発明の判定方法を行えば、Rh式血液型を判定することができる。即ち、D型、C型、E型、c型又はe型の判定を一回の操作で同時に行うことができる。

【0040】即ち、図4に示すように、本発明に係る多孔体に固定化された抗D抗体、抗C抗体、抗E抗体、抗c抗体及び抗e抗体に、赤血球を含む液体試料を上方から滴下接触させ、その結果生じる当該抗D抗体、抗C抗体、抗E抗体、抗c抗体及び抗e抗体の固定部分（判定部）に於ける赤血球の結合に由来する着色をもとに当該試料の血液型の判定を行えばよい。尚、図4で用いた液体試料はRh式血液型がE型である赤血球を含有するものである。

【0041】尚、上記Rh式血液型の判定に於いては、その重要性から、D型の判定が、C型、E型、c型及びe型の判定に先立って行われる場合が多いので、このような場合には、C型、E型、c型及びe型の判定と同時にD型の判定を行う必要はない。従って、上記のRh式血液型判定方法には、抗C抗体、抗E抗体、抗c抗体及び抗e抗体のみを用いたものも包含される。

【0042】即ち、上記Rh式血液型の判定に於いて、抗D抗体固定部位に赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはD型の抗原が存在していることから、Rh式血液型がD型と判定され、抗C抗体固定部位（C型判定部）に赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはC型の抗原が存在していることから、Rh式血液型がC型と判定され、抗E抗体固定部位（E型判定部）に赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはE型の抗原が存在していることから、Rh式血液型はE型と判定される。また、抗c抗体固定部位（c型判定部）に赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはc型の抗原が存在していることから、R

h式血液型はc型と判定され、抗e抗体固定部位（e型判定部）に赤血球の結合に由来する着色が認められた場合、試料中の赤血球にはe型の抗原が存在していることから、Rh式血液型はe型と判定される。

【0043】本発明に於ける液体試料としては、赤血球を含むものであればよいが、例えば、血液、これから分離して得られた赤血球、或いはこれらを適当な等張緩衝液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水等）、生理食塩水等で希釈或いは懸濁させて得られる液体試料等が挙げられる。

【0044】また、当該液体試料中の赤血球濃度としては、通常0.1~80%、好ましくは0.5~50%、より好ましくは1~50%である。

【0045】本発明の血液型判定用試験用具及び血液型判定用試薬キットは、上述した如き本発明の血液型判定方法に使用されるもので、血液型特異的結合物質が上面に固定化された、赤血球が毛管現象により浸透可能な多孔体からなるものであり、要すれば、下面に吸収体を接触させてもよい。

【0046】尚、本発明の試験用具又はキットは単一の本発明に係る多孔体からなるものであっても、複数の本発明に係る多孔体を組み合わせて一体に構成したものであってもよい。

【0047】また、本発明の試験用具又はキットの主要構成要素である血液型特異的結合物質や本発明に係る多孔体の好ましい態様や具体例は上で述べた通りである。

【0048】本発明の血液型判定用試薬キットの好ましい態様としては、上記した如き本発明の血液型判定用具と、例えば陽性コントロール又は／及び陰性コントロール、血液希釈用等張液（例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）等）を適宜組み合わせたもの等が挙げられる。

【0049】本発明の試験用具の態様の例を図5~9に示す。尚、図7はABO式血液型の判定に用いられる試験用具の好ましい態様の一つ、図8はABO式血液型の判定とD型の判定を同時に行う際に用いられる試験用具の好ましい態様の一つ、図9はRh式血液型の判定に用いられる試験用具の好ましい態様の一つをそれぞれ示す。

【0050】図5に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 本発明に係る多孔体
- 2 : 血液型特異的結合物質固定部分（判定部）

【0051】図6に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- 4 : 血液型特異的結合物質固定部分（判定部）

【0052】図7に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- 4 : 抗A抗体固定部分（A型判定部）
- 5 : 抗B抗体固定部分（B型判定部）

【0053】図8に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- 4 : 抗A抗体固定部分（A型判定部）
- 5 : 抗B抗体固定部分（B型判定部）
- 6 : 抗D抗体固定部分（D型判定部）

【0054】図9に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- (4) : 抗D抗体固定部分（D型判定部）
- 5 : 抗C抗体固定部分（C型判定部）
- 6 : 抗E抗体固定部分（E型判定部）
- 7 : 抗c抗体固定部分（c型判定部）
- 8 : 抗e抗体固定部分（e型判定部）

【0055】尚、前述した如く、Rh式血液型の判定に於いては、その重要性から、D型の判定が、C型、E型、c型及びe型の判定に先立って行われる場合が多いので、このような場合には、C型、E型、c型及びe型の判定と同時にD型の判定を行う必要はない。従って、上記の本発明に係るRh式血液型の判定に用いられる試験用具には、抗C抗体、抗E抗体、抗c抗体及び抗e抗体のみを固定化させた本発明に係る多孔体からなるRh式血液型判定用試験用具も包含される。

【0056】上記した如き例えば図6乃至図9で示される本発明の試験用具を調製するに当たっては、先ず、血液型特異的結合物質（例えば、抗A抗体、抗B抗体、抗D抗体、抗C抗体、抗E抗体、抗c抗体、抗e抗体等）が固定化された判定部を有する本発明に係る多孔体を作製した後、要すれば、その下面に吸収体を接着し、液体試料を効率よく吸収し得るようにする。

【0057】更に、上方より滴下された液体試料が本発明に係る多孔体の表面全体に急速に広がり、赤血球が判定部位以外の表面からも浸透することで該多孔体に固定化された血液型特異的結合物質と接触する量が少なくなり、判定部での着色が薄くなって判定が困難となるのを防止する目的で、本発明に係る多孔体の上面に、血液型特異的結合物質が固定化された判定部分を含むように、中央をくり抜いた非吸収体（打ち抜き部を有する非吸収体）を接着させ、液体試料を判定部位とが充分接触し得るようにしてもよい。

【0058】これら非吸収体としては、例えばポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン等の材質からなるシート状乃至膜状物が挙げられる。

【0059】以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらによって何等限定されるものではない。

【0060】

【実施例】実施例 1

(1) 抗体固定多孔体(展開膜)の作成

血液型抗A抗体〔モノクローナル抗Aワコー：和光純薬工業(株)〕を多孔体であるニトロセルロース膜(孔径：12 μ m、ワットマン社製)(1.5cm \times 0.8cm)に対して塗布機(リノマート：カマグ社製)により下端より0.45cmの位置に線塗布した(0.5 μ l/cm²) A型判定部位を作製し、同じ多孔体上面の別の部位(下端より0.75cm)に血液型抗B抗体〔モノクローナル抗Bワコー：和光純薬工業(株)〕を塗布機により線塗布して(0.5 μ l/cm²) B型判定部位を作製し、更に同じ多孔体上面の別の部位(下端より1.05cm)に血液型抗D抗体〔モノクローナル抗Dワコー：和光純薬工業(株)〕を塗布機により線塗布して(0.5 μ l/cm²) D型判定部位を作製し、抗A型抗体、抗B型抗体及び抗D型抗体の3本の判定部を作製した。該多孔体を乾燥させた後、50mM リン酸緩衝液(1% ショ糖及び1% BSA含有、pH7.2)中に30分間浸し、次いで、50mM リン酸緩衝液(1% ショ糖及び1% ポリ(ビニルピロリドン)-コ-ビニル酢酸含有、pH7.2)により洗浄した後、乾燥させて、判定部位を有する多孔体を作製した。

【0061】(2) 試験用具の組立

吸収体である脱脂綿(2cm \times 2cm)の上に、多孔体を密着するように乗せ、その上に多孔体が有する判定ラインを塗布した部分に相当する部分が液体試料滴下部となるような打ち抜きを設けた不透明な非吸収性接着シート(2cm \times 2cm)を乗せて、多孔体を脱脂綿に固定し、図10に示す試験用具を作製した。

【0062】図10に於いて各数字は以下のものを示す。

- 1：非吸収性シート
- 2：本発明に係る多孔体
- 3：抗A抗体固定部分(A型判定部)
- 4：抗B抗体固定部分(B型判定部)
- 5：抗D抗体固定部分(D型判定部)
- 6：吸収体
- 7：打ち抜き部

【0063】(3) 血液型判定方法

(2)で作製した試験用具の液体試料滴下部に、液体試料(例えば血液又は血球浮遊液)1滴を滴下し、10数秒放置して、該液体試料が展開膜に吸収された後、洗浄液(例えば生理食塩水)を3滴滴下し、これが吸収された後に判定部の着色を観察した。この結果、液体試料にA

型の血液を用いた場合には、A型判定部のみに赤血球に由来する着色が認められ、B型判定部には着色は認められず、液体試料にB型の血液を用いた場合には、B型判定部のみに赤血球に由来する着色が認められ、A型判定部には着色は認められなかった。また、液体試料にAB型の血液を用いた場合には、A型判定部及びB型判定部共に赤血球に由来する着色が認められた。液体試料にO型の血液を用いた場合には、A型判定部及びB型判定部の何れにも赤血球に由来する着色は認められなかった。また液体試料にRh陽性の血液を用いた場合には、D型判定部に赤血球に由来する着色が認められ、液体試料にRh陽性の血液を用いた場合にはD型判定部に赤血球に由来する着色は認められなかった。

【0064】これらの結果より、本発明の試験用具を用いて血液型の判定を行えば、ABO型の判定(表試験)が一回の操作で15~30秒程度で簡単に行え、更にはRh陽性・陰性の判定も同時に行えることが判る。

【0065】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は、簡便で、高精度な血液型判定方法、及びこれに用いる血液型判定用試験用具並びに試薬キットを提供するものであり、本発明を利用することにより、簡便に、精度良く生体由来試料の血液型を判定することができ、更には血液型を1回の操作で例えば1分以内という極めて短時間で判定することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の血液型判定方法の好ましい態様の原理を模式的に示す図である。

【図2】本発明の血液型判定方法の好ましい態様の原理を模式的に示す図である。

【図3】本発明の血液型判定方法の好ましい態様の原理を模式的に示す図である。

【図4】本発明の血液型判定方法の好ましい態様の原理を模式的に示す図である。

【図5】本発明の血液型判定用試験用具の態様の一例を示す図である。

【図6】本発明の血液型判定用試験用具の好ましい態様の一つを示す図である。

【図7】本発明の血液型判定用試験用具の好ましい態様の一つを示す図である。

【図8】本発明の血液型判定用試験用具の好ましい態様の一つを示す図である。

【図9】本発明の血液型判定用試験用具の好ましい態様の一つを示す図である。

【図10】本発明の血液型判定用試験用具の好ましい態様の一つを示す図である。

【符号の説明】

図5に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1：本発明に係る多孔体
- 2：血液型特異的結合物質固定部分(判定部)

図6に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- 4 : 血液型特異的結合物質固定部分 (判定部)

図7に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- 4 : 抗A抗体固定部分 (A型判定部)
- 5 : 抗B抗体固定部分 (B型判定部)

図8に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- 4 : 抗A抗体固定部分 (A型判定部)
- 5 : 抗B抗体固定部分 (B型判定部)
- 6 : 抗D抗体固定部分 (D型判定部)

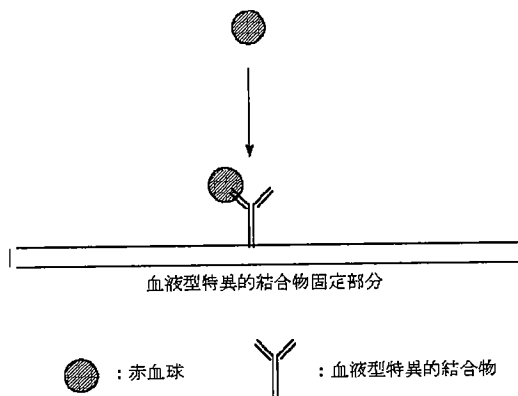
図9に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収体
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 吸収体
- (4) : 抗D抗体固定部分 (D型判定部)
- 5 : 抗C抗体固定部分 (C型判定部)
- 6 : 抗E抗体固定部分 (E型判定部)
- 7 : 抗c抗体固定部分 (c型判定部)
- 8 : 抗e抗体固定部分 (e型判定部)

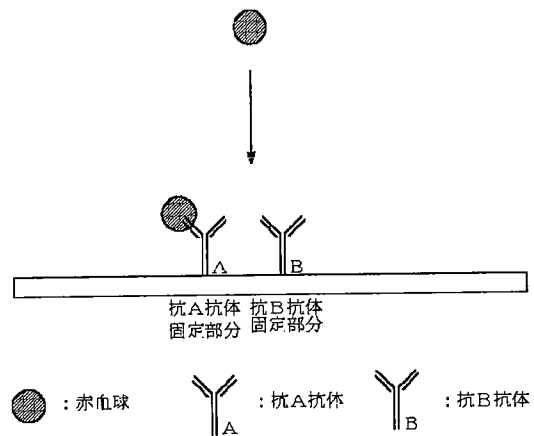
図10に於いて各数字は夫々以下のものを示す。

- 1 : 非吸収性シート
- 2 : 本発明に係る多孔体
- 3 : 抗A抗体固定部分 (A型判定部)
- 4 : 抗B抗体固定部分 (B型判定部)
- 5 : 抗D抗体固定部分 (D型判定部)
- 6 : 吸収体
- 7 : 打ち抜き部

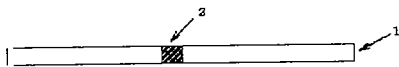
【図1】



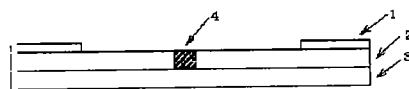
【図2】



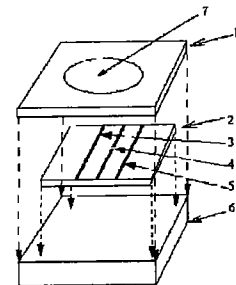
【図5】



【図6】



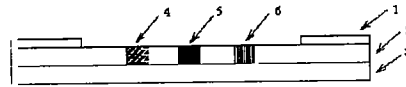
【図10】



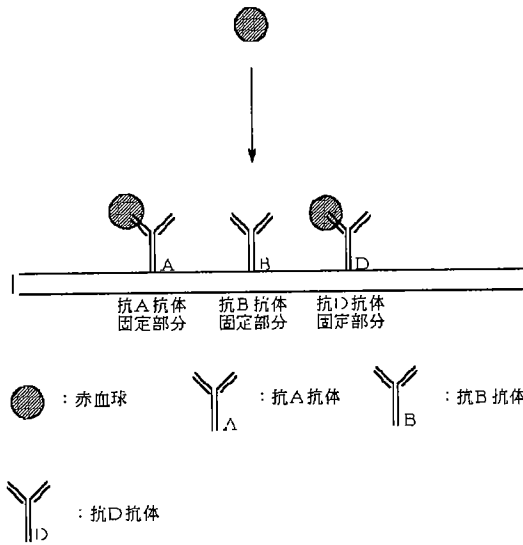
【図7】



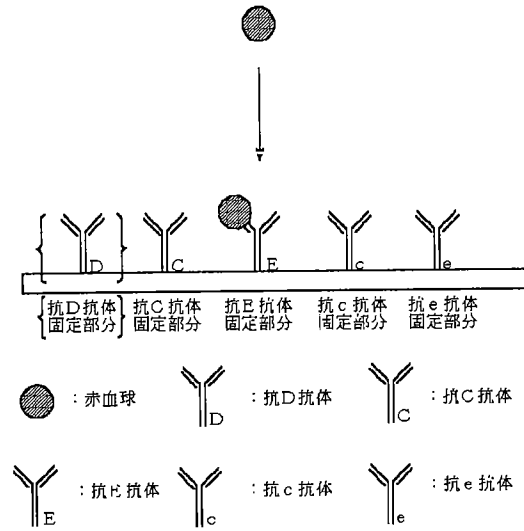
【図8】



【図3】



【図4】



【図9】

